

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-169841

(43)公開日 平成8年(1996)7月2日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 38/21

38/00

識別記号

A B Y

A C A

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

A 6 1 K 37/ 66

A B Y G

37/ 02

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-333684

(22)出願日

平成6年(1994)12月16日

(71)出願人

000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72)発明者

高山 和江

岡山県岡山市桑野525番地の3号

(72)発明者

原島 哲

岡山県岡山市桑野525番地の3号

(72)発明者

太田 恒孝

岡山県岡山市平井3丁目1015番48号

(72)発明者

栗本 雅司

岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

(54)【発明の名称】 血小板増多促進剤

(57)【要約】

【目的】 血小板を効果的に増多することのできる血小板増多促進剤を提供する。

【構成】 血小板を効果的に増多することのできる有効成分としてインターフェロン- $\gamma$ および血小板増多作用を有する生理活性物質を含有する血小板増多促進剤を構成とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 有効成分としてインターフェロン- $\gamma$ および血小板増多作用を有する生理活性物質を含有する血小板増多促進剤。

【請求項2】 インターフェロン- $\gamma$ が、天然型または遺伝子組換え型インターフェロン- $\gamma$ である請求項1に記載の血小板増多促進剤。

【請求項3】 血小板増多作用を有する生理活性物質が、インターロイキン-3、インターロイキン-6、顆粒球コロニー刺激因子、食食細胞コロニー刺激因子、顆粒球食食細胞コロニー刺激因子、幹細胞増殖因子、トロンボポイエチンおよびエリスロポイエチンから選ばれる1種または2種以上の物質である請求項1または2に記載の血小板増多促進剤。

【請求項4】 血小板増多作用を有する生理活性物質の配合量が、それ単独では血小板増多作用を示さない量である請求項1、2または3に記載の血小板増多促進剤。

【請求項5】 インターフェロン- $\gamma$ および/または血小板増多作用を有する生理活性物質の安定化剤として、1種または2種以上の糖類、塩類、アミノ酸、血清アルブミン、ゼラチン、非イオン界面活性剤、グルクロン酸、デキストランおよびヒドロキシエチル澱粉、並びにこれらの組み合わせを含有する請求項1、2、3または4に記載の血小板増多促進剤。

【請求項6】 インターフェロン- $\gamma$ がg当たり約0.1～10<sup>9</sup>単位、および血小板増多作用を有する生理活性物質がg当たり10～10<sup>9</sup>単位配合されていることを特徴とする請求項1、2、3、4または5に記載の血小板増多促進剤。

【請求項7】 血小板増多促進剤が、経口または非経口的に投与可能な剤形である請求項1、2、3、4、5または6に記載の血小板増多促進剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、血小板増多促進剤、とりわけ、有効成分としてインターフェロン- $\gamma$ （以下、「IFN- $\gamma$ 」と略称する。）および血小板増多作用を有する生理活性物質（以下、単に「生理活性物質」と略称することもある。）を含有するヒトを含む哺乳動物の血小板増多促進剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】血小板は哺乳動物の血液中存在し、例えばヒトの場合、直径2～3 $\mu$ mの無核の細胞で、血液1mm<sup>3</sup>当たり約15万～40万個存在し、巨核球前駆細胞が増殖して巨核球に分化し、成熟した後、その胞体から放出される。その寿命は約11日である。この血小板は、傷害された血管内皮細胞に接触し、そこで粘着、凝集反応を起こし、止血作用を発揮する。

【0003】正常なヒトの血液中存在する血小板の数は、前記範囲に保たれているが、骨髓に於ける血小板産

生能の低下、末梢での血小板の利用ないし崩壊の亢進により、また、血小板の分布異常などによってその数が減少することがある。血小板が減少する原因としては、骨髓異形成症候群、白血病、骨髓への癌転移、骨髓腫、ホジキン氏病、リンパ肉腫、骨髓繊維病、骨髓硬化症、肥大型骨関節症、大理石骨病などの骨髓を直接傷害する疾患、更にパンチ症候群、細網肉腫、梅毒および脾腫をともなう悪性腫瘍などの脾臓を傷害する疾患などが挙げられる。木村郁郎と高橋功が『トキシコロジー・フォーラム』、第11巻、第2号、第112～121頁（1988年）に於いて報告しているように、悪性腫瘍の治療として用いられる放射線療法や化学療法により骨髓障害が誘起され、血小板の減少が引き起こされることを報告している。

【0004】血小板の減少は、生体の止血機能低下を意味し、皮膚の点状出血、鼻血、口腔粘膜出血、尿路出血あるいは性器出血などを誘起し、時として、消化管内出血や頭蓋内出血などを誘起する。また、血小板の減少は、その原因となる疾患や悪性腫瘍の治療および予後にも悪影響を与える。

【0005】従来から、血小板減少の治療方法として成分輸血や自己または非自己骨髓移植などが行われてきたが、成分輸血は、血小板の寿命が他の血液成分に比べて短いこと、また自己または非自己骨髓移植は、移植された骨髓の定着が容易でないことから何れも根本的な治療方法とはいえない。

【0006】近年、血小板数変動と関連があるとされる巨核球の分化・成熟に、インターロイキン-3（以下、「IL-3」と略称する。）、インターロイキン-6（以下、「IL-6」と略称する。）、顆粒球コロニー刺激因子（以下、「G-CSF」と略称する。）、顆粒球食食細胞コロニー刺激因子（以下、「GM-CSF」と略称する。）、幹細胞増殖因子（以下、「SCF」と略称する。）、およびエリスロポイエチン（以下、「EPO」と略称する。）などの生理活性物質が関与していることがイン・ビトロの系で確認されている（ロナルド・ホフマン、『ブラッド』、第74巻、第4号、第1、196～1、212頁（1989年）；エリック・エム・マズール、『エクスペリメンタル・ヘマトロジー』、第15巻、第340～350頁（1987年）；およびハバ・アブラハム、『ステム・セルズ』、第11巻、第499～510頁（1993年））。

【0007】ある種の生理活性物質を哺乳動物に投与して、直接的に巨核球を増殖刺激したり、分化誘導刺激して、血小板産生能を高める試みがなされているが、満足な成果を上げるには至っていない。それは、使用した生理活性物質の増殖、分化誘導刺激能が低かったり、また、イン・ビトロでの巨核球の増殖あるいは分化誘導が、イン・ビボでの血小板増多と必ずしも結びつかなかったからである。

【0008】一般に、生理活性物質は、巨核球の増殖刺激作用や分化誘導刺激作用と共に、血液細胞前駆体の増殖作用、つまり、好中球、リンパ球、赤血球および脾臓中の肥満細胞増殖作用を有していることが知られ（オガワ マキオ、『ブラッド』、第81巻、第11号、第2, 844~2, 853頁（1993年））、巨核球特異的であるとは言えない。例えば、IL-6は、血液細胞全般の成熟を誘導し（キシモト タダミツ、『ブラッド』、第74巻、第1号、第1~10頁（1989年））、EPOは赤血球の成熟を誘導することが知られている（エル・カンズ等、『アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー』、第14巻、サプリメント1、第S27~33頁（1991年）および元吉和夫、『日本臨床』、第50巻、第8号、1, 967~1, 972頁（1992年））。

【0009】更に、最近、生理活性物質である血小板増殖因子（トロンボポイエチン（以下、「TPO」と略称する。））が単離され、TPOに血小板増多作用があることが報告されたが、その詳細な作用機構は依然不明のままである（フレデリック・ジェイ・デ・サウベジ等、『ネイチャー』、第369巻、第533~538頁（1994年）；フランソワ・ヴェンドリング等、『ネイチャー』、第369巻、第571~574頁（1994年）；シー・ロック等、『ネイチャー』、第369巻、第565~568頁（1994年）；およびティール・パートレイ等、『セル』、第77巻、第1, 117~1, 124頁（1994年））。斯る状況下、ヒトを含む哺乳動物に見られる血小板減少を効果的に予防および／または治療することのできる安全な血小板増多促進剤が希求されている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、血小板を効果的に増多することのできる血小板増多促進剤を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、前記課題を有効成分としてIFN- $\gamma$ および血小板増多作用を有する生理活性物質を含有する血小板増多促進剤により解決するものである。

【0012】本発明者等は、各種疾患により誘起される血小板減少症や、悪性腫瘍などの疾患を治療するために行われる放射線療法や化学療法などによって誘起される血小板減少症を予防および／または治療するための薬剤について研究を続けてきた。より具体的には、血小板増多作用を有する生理活性物質に着目し、その作用を有効に発揮し、増強する方法について検討した。

【0013】その結果、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用および免疫作用を有することが知られているIFN- $\gamma$ を、血小板増多作用を有する生理活性物質と共に哺乳動物に投与したとき、顕著な血小板増多作用が誘起される

ことを見い出した。

【0014】通常、IFN- $\gamma$ 自体は血小板増多作用を示さないばかりか、逆に、血小板減少作用を示すものであるが、血小板増多作用を有する生理活性物質と併用したとき、当該生理活性物質がそれ単独では血小板増多作用を示さないような低投与量に於いても、当該生理活性物質の作用を増強し、顕著な血小板増多作用を誘導することを新規に見い出した。即ち、少量の生理活性物質と少量のIFN- $\gamma$ により効果的に血小板増多作用を発揮できるのである。これは、IFN- $\gamma$ または血小板増多作用を有する生理活性物質などの大量投与が、副作用を惹起するという問題を有している点からも優れた効果といえる。

【0015】本発明の血小板増多促進剤が有効成分として含有するIFN- $\gamma$ としては、例えば、IFN- $\gamma$ 産生能を有するヒトまたは哺乳動物の白血球や培養株化細胞から産生される天然型IFN- $\gamma$ 、および、前記白血球や特定の培養株化細胞由来のIFN- $\gamma$ をコードする遺伝子を、組換えDNA技術により動物細胞や大腸菌などの微生物に組み込んで得られる組換え型IFN- $\gamma$ などを使用することができる。本発明に於いては、比活性 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質以上にまで高度に精製された高純度IFN- $\gamma$ は言うに及ばず、所期の目的を達成し得る限り、医薬として許容し得る程度の不純物を含む粗なIFN- $\gamma$ も使用可能である。また、必要に応じて、2種以上のIFN- $\gamma$ 混合物を用いてもよい。また、IFN- $\gamma$ には種特異性があること、また抗原性の点からも、ヒトに使用する場合にはヒト由来のIFN- $\gamma$ を、ヒト以外の動物に使用する場合にはその動物と同じ種に由来するIFN- $\gamma$ を用いるのが望ましい。

【0016】本発明で使用する血小板増多作用を有する生理活性物質としては、IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF、SCF、TPO、食細胞コロニー刺激因子（以下、「M-CSF」と略称する。）およびエリスロポイエチン（以下、「EPO」と略称する。）を使用することができる。これら生理活性物質は、その物質によっても異なるが、一般的には、比活性 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質以上にまで高度に精製された高純度生理活性物質のみならず、所期の目的が達成できる限り、医薬として許容し得る程度の不純物を含む粗な天然型および遺伝子組換え型ヒトおよびヒト以外の哺乳動物由来の生理活性物質の何れをも使用することができる。必要に応じて、それらの2種以上の生理活性物質を併用することもできる。また、前記生理活性物質の中には種特異性を有するものもあること、また抗原性の点からも、ヒトに使用することを意図する場合にはヒト由来のものを、ヒト以外の哺乳動物に使用することを意図する場合には、その哺乳動物と同じ種に由来するものを用いるのが望ましい。

【0017】更に、本発明の血小板増多促進剤は、その

有効成分であるIFN- $\gamma$ と生理活性物質に加えて、医薬として許容し得る増量剤、賦形剤、安定化剤およびpH調節剤などの1種または2種以上を適宜配合してもよい。

【0018】前記安定化剤とは、IFN- $\gamma$ および/または血小板増多作用を有する生理活性物質の安定化剤を意味し、例えば、グルコース、ガラクトース、キシロース、フラクトース、スクロース、マルトース、トレハロース、ネオトレハロース、ソルビトール、マンニトール、マルチトール、ラクチトール、ラクトスクロース、マルトオリゴ糖、多糖類、サイクロデキストリン、ヒドロキシエチル澱粉、デキストリンおよびデキストランなどの糖類、グルクロン酸ナトリウム、リン酸塩および金属塩などの塩類、血清アルブミン、ゼラチン、アミノ酸および非イオン界面活性剤などの1種または2種以上を使用することができる。前記安定化剤の配合割合は特に限定されないが、非イオン界面活性剤を除き、通常0.01~50w/w%、より好ましくは、1~50w/w%である。非イオン界面活性剤の配合割合は、IFN- $\gamma$ および生理活性物質を含有する溶液1ml当たり1 $\mu$ g~1mg、より好ましくは10 $\mu$ g~1mgが望ましい。前記安定化剤を前記割合で添加した場合は、IFN- $\gamma$ および生理活性物質の活性は、4℃の条件下で、通常、6カ月以上の長期に亘って安定に保たれる。

【0019】本発明の血小板増多促進剤の有効成分であるIFN- $\gamma$ の配合量は、血小板増多作用を有する生理活性物質の作用を増強し得る量であり、通常、血小板増多促進剤g当たり、IFN- $\gamma$ を約0.1~10<sup>9</sup>単位配合するのが望ましい。また、生理活性物質は、同じくg当たり約10~10<sup>10</sup>単位配合するのが望ましい。本発明の血小板増多促進剤の形状は、液状、ペースト状、粉状、固状などの経口または非経口投与可能な形状が選ばれる。とりわけ、非経口的に投与可能な剤形が望ましい。本発明の血小板増多促進剤を液状およびペースト状とする場合には、IFN- $\gamma$ および生理活性物質が失活しないpH、つまり、pH約4~9、望ましくは、pH6~8に調整する。本発明の血小板増多促進剤はその形状、形態に拘わらず、4℃以下の冷暗所で保存するのが活性を安定に保つ上で望ましい。

【0020】次に、本発明の血小板増多促進剤の投与方法について説明するに、ヒトを含む哺乳動物に対し、IFN- $\gamma$ を1 $\times$ 10乃至1 $\times$ 10<sup>7</sup>単位/kg/日、望ましくは、1 $\times$ 10乃至1 $\times$ 10<sup>5</sup>単位/kg/日、より望ましくは、1 $\times$ 10乃至1 $\times$ 10<sup>3</sup>単位/kg/日、および生理活性物質を1 $\times$ 10<sup>2</sup>乃至1 $\times$ 10<sup>8</sup>単位/kg/日、望ましくは、1 $\times$ 10<sup>2</sup>乃至1 $\times$ 10<sup>5</sup>単位/kg/日、より望ましくは、1 $\times$ 10<sup>2</sup>乃至1 $\times$ 10<sup>4</sup>単位/kg/日、一日に1回乃至数回または連続的に、経口的または非経口的に投与すればよい。経口投与する場合には、液剤、ペースト剤、錠剤、顆粒剤、粉剤、カ

プセルおよびパップ剤などの剤形が、非経口投与としては、筋注、静注、皮下投与、腹腔内投与あるいは浸透圧ポンプ投与などに適した液状または固状の剤形が選ばれる。投与期間は特に限定されず、投与量、患者および患者の症状に応じて適宜設定すればよい。

【0021】以下、本発明を実験例と実施例により詳細に説明する。

【0022】

【実験例1 血小板増多作用】

【0023】

【実験例1-1 血小板減少症モデルマウスの作製】生後7週齢のBDF1雌マウス（体重約20g）に対して、リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）に溶解した5-フルオロウラシル（5-FU）を、マウス体重kg当たり250mg腹腔内に1回投与して、血小板減少症モデルマウスを作成した。5-FU投与後、14日目まで一日一回、ユノベット（日本ベクトン・ディキンソン社製）を用いて眼底採血を行い、顕微鏡下で血小板数を計数し、血液中の血小板数変動を調べた。対照として、5-FU非投与マウスを用いた。その結果を図1に示す。

【0024】図1から明らかなように、マウスに5-FUを投与することにより、血小板減少症モデルマウスを容易に作製することができる。尚、この実験系では、5-FUを投与したマウスの血小板は、徐々に減少した後、徐々に増加し、5-FU投与前の血小板数以上にまで増加するが、その後、徐々に減少し、正常値に戻るといった経過を辿る。

【0025】【実験例1-2 血小板減少症モデルマウスに影響を及ぼさない血小板増多作用を有する生理活性物質の投与量の決定】実験例1-1で作成した血小板減少症モデルマウスに所定量の血小板増多作用を有する生理活性物質を連続的に投与するために、常法により浸透圧ポンプ1007D型（アルゼット社製、米国）をマウスの皮下に埋設し、リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）に溶解した生理活性物質を0.5 $\mu$ l/時間の割合で連続的に皮下に放出させた。血小板増多作用を有する生理活性物質としては、比活性2 $\times$ 10<sup>7</sup>単位/mg蛋白質の遺伝子組換えマウスIL-3（ゼンザイム社製、米国）を、1 $\times$ 10<sup>3</sup>単位/kg/日および1 $\times$ 10<sup>5</sup>単位/kg/日の割合で血小板減少症モデルマウスに投与し、血小板数変動を調べた。対照として、IL-3不含のリン酸緩衝生理食塩水を血小板減少症モデルマウスに投与した。その結果、IL-3を1 $\times$ 10<sup>5</sup>単位/kg/日投与した場合、血小板増多が認められたのに対し、1 $\times$ 10<sup>3</sup>単位/kg/日投与した場合には、血小板増多は認められなかった。その結果を図2に示す。

【0026】図2の結果から、血小板減少症モデルマウスに対して血小板増多を示さないIL-3単独での投与量は、1 $\times$ 10<sup>3</sup>単位/kg/日と決定した。

【0027】

【実験例1-3 IFN- $\gamma$ 単独投与による血小板数変動に及ぼす影響】実験例1-1で作成した血小板減少症モデルマウスに、リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)に溶解した比活性約 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質を有する遺伝子組換え型マウスIFN- $\gamma$ (ゼンザイム社製、米国)を2.5、 $2.5 \times 10$ および $2.5 \times 10^2$ 単位/kg/日の投与量で、実験1-2と同様にして浸透圧ポンプを用いてマウスに投与し、IFN- $\gamma$ の血小板数変動に及ぼす影響について調べた。対照として、IFN- $\gamma$ 不含のリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)を血小板減少症モデルマウスに投与した。結果は、図3に示した。

【0028】図3から明らかなように、IFN- $\gamma$ は血小板減少症モデルマウスに対して血小板減少症を促進することが判明した。つまり、IFN- $\gamma$ 自体には血小板増多作用はなく、それ単独で投与した場合は、逆に血小板減少作用を示すものである。

【0029】

\* 【表1】

	実験No.	投 与 量 (単位/kg/日)	
		IFN- $\gamma$	IL-3
血小板減少症 モデルマウス	1 (対照)	0	0
	2	$2.5 \times 10$	0
	3	$2.5 \times 10^2$	0
	4	0	$1 \times 10^3$
	5	$2.5 \times 10$	$1 \times 10^3$
	6	$2.5 \times 10^2$	$1 \times 10^3$

【0031】図4の結果から明らかなように、IFN- $\gamma$ とIL-3を投与した実験No.5(IFN- $\gamma$ : $2.5 \times 10$ 単位/kg/日、IL-3: $1 \times 10^3$ 単位/kg/日)と実験No.6(IFN- $\gamma$ : $2.5 \times 10^2$ 単位/kg/日、IL-3: $1 \times 10^3$ 単位/kg/日)のマウスに於いては、5-FU投与後7日目から血小板増多が認められ、8日目以降、顕著な血小板増多が認められた。また、実験No.2と3のマウスに於いては、実験1-3の結果と同様、濃度依存的にIFN- $\gamma$ による血小板減少作用が見られた。また、本実験結果には、5-FU投与後14日目以降のデータは示してい

\* 【実験例1-4 IFN- $\gamma$ と血小板増多作用を有する生理活性物質との併用投与】実験例1-1で作成した血小板減少症モデルマウスに、各種濃度のIFN- $\gamma$ および血小板増多作用を有する生理活性物質を溶解したリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)を実験例1-2の方法により投与した。IFN- $\gamma$ は、比活性約 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質を有する遺伝子組換え型マウスIFN- $\gamma$ (ゼンザイム社製、米国)を、血小板増多作用を有する生理活性物質としては、比活性 $2 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質の遺伝子組換えマウスIL-3(ゼンザイム社製、米国)を用いた。IFN- $\gamma$ とIL-3の投与量は表1に示したとおりである。対照として、浸透圧ポンプを埋設した血小板減少症モデルマウスに、IFN- $\gamma$ およびIL-3不含のリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)を、前記同様に血小板減少症モデルマウスに投与した。結果は、図4に示した。

【0030】

\* 【表1】

ないが、本発明の血小板増多促進剤を投与したマウスは、実験No.1の対照マウスと比べ、より短期間にその血小板数が正常値に戻る傾向にあった。

【0032】また、具体的な数値は示さないが、前記実験例と同様にして、血小板減少症モデルマウスに対して、各種天然型または遺伝子組換え型マウス由来のIFN- $\gamma$ と血小板増多作用を有するIL-6、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、SCF、EPOまたはTPOとを適宜組み合わせることで試験をしたところ、前記実験結果と同様、5-FU投与後8日目以降に顕著な血小板増多を認めた。

【0033】これらの結果から、IFN- $\gamma$ 自体は血小板減少を誘導するにも拘わらず、血小板増多作用を有する生理活性物質と併用したとき、その生理活性物質の作用を著しく増強することが判明した。

【0034】

【実験例3 IFN- $\gamma$ と血小板増多作用を有する生理活性物質の配合量の決定】

【0035】

【実験例3-1 IFN- $\gamma$ の最少有効投与量の決定】

実験例1-1に示す血小板減少症モデルマウスを用いて、実験例1-2で述べた方法により、比活性 $2 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質の遺伝子組換えマウスIL-3（ゼンザイム社製、米国）を $1 \times 10^3$ 単位/kg/日、および比活性約 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質を有する遺伝子組換え型マウスIFN- $\gamma$ （ゼンザイム社製、米国）を $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^3$ 単位/kg/日の投与量で、血小板減少症モデルマウスに投与し、血小板数変動を観察した。その結果、それ単独では血小板増多を誘導しないIL-3投与量においても、 $1 \times 10$ 単位/kg/日以上IFN- $\gamma$ を併用した場合には、統計学的に有意な血小板増多が認められた。この結果から、IFN- $\gamma$ の最少有効投与量は $1 \times 10$ 単位/kg/日と決定した。

【0036】

【実験例3-2 血小板増多作用を有する生理活性物質の最少有効投与量の決定】実験例1-1に示す血小板減少症モデルマウスを用いて、実験例1-2で述べた方法により、比活性 $2 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質の遺伝子組換えマウスIL-3（ゼンザイム社製、米国）を $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^4$ 単位/kg/日、および比活性約 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質を有する遺伝子組換え型マウスIFN- $\gamma$ （ゼンザイム社製、米国）を $1 \times 10^5$ 単位/kg/日の投与量でマウスに投与し、血小板数変動を観察した。その結果、IL-3を $1 \times 10^2$ 単位/kg/日以上マウスに投与した場合にのみ統計学的に有意な血小板増多が認められたことから、IFN- $\gamma$ と併用したときのIL-3の最少有効投与量は $1 \times 10^2$ 単位/kg/日と決定した。この投与量は、実験例1-2および実験例1-4の結果と比較すると、IL-3単独投与で血小板増多作用を示すために必要とされる最少投与量の $1/10$ 以下の量である。

【0037】また、具体的な数値は示さないが、前記実験と同様にして、血小板減少症モデルマウスに対して、各種天然型または遺伝子組換え型マウスIFN- $\gamma$ と血小板増多作用を有するIL-6、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、SCF、EPOまたはTPOとを適宜組み合わせて実験したところ、前記実験結果と同様の結果を得た。

【0038】

【実験例4 急性毒性試験】7週齢のdd系マウス（体

重約30g）に対し、比活性 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質を有する天然型ヒトIFN- $\gamma$ （株式会社林原生物学研究所製）および比活性 $2 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質の遺伝子組換えヒトIL-3（ゼンザイム社製、米国）を、それぞれ $1 \times 10^8$ 単位/kgマウス体重の投与量で、皮下および静脈に投与したところ、死亡例は認められなかった。また同様に、マウスに対して遺伝子組換え型ヒトまたはヒト以外の哺乳動物由来のIFN- $\gamma$ とIL-6、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、SCF、EPOまたはTPOとを適宜組み合わせて投与試験をしたところ、前記実験結果と同様、死亡例は認められなかった。したがって、本発明の血小板増多促進剤は極めて安全な薬剤であると言える。

【0039】

【実施例1】比活性約 $1 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質を有する天然型ヒトIFN- $\gamma$ （株式会社林原生物化学研究所製）と、比活性約 $2 \times 10^7$ 単位/mg蛋白質を有する遺伝子組換え型ヒトIL-3（ゼンザイム社製、米国）とを、ml当たりそれぞれ $2 \times 10^2$ 単位および $2 \times 10^3$ 単位となるように注射用生理食塩水に溶解して血小板増多促進剤を得た。

【0040】本品は、骨髓異形成症候群、白血病、骨髓への癌転移、骨髓腫、ホジキン氏病、リンパ肉腫、骨髓繊維病、骨髓硬化症、肥大型骨関節症、大理石骨病、パンチ症候群、細網肉腫、梅毒あるいは悪性腫瘍などによって誘起される血小板減少症、および、悪性腫瘍の治療として用いられる放射線療法や化学療法の副作用として誘起される血小板減少を予防および/または治療するための点滴用血小板増多促進剤として使用できる。また、本品は、腎不全患者の血小板増多促進剤としても有利に使用できる。

【0041】

【実施例2】比活性約 $1 \times 10^6$ 単位/mg蛋白質を有する天然型ヒトIFN- $\gamma$ （日本ケミカルリサーチ株式会社製）と、比活性 $1 \times 10^6$ 単位/mg蛋白質の遺伝子組換え型ヒトGM-CSF（セルバ社製、独国）とを、ml当たりそれぞれ $1 \times 10^3$ 単位および $1 \times 10^4$ 単位となるように注射用生理食塩水に溶解し、濾過滅菌し、凍結乾燥して粉末状の注射用血小板増多促進剤を得た。

【0042】本品は、用時、注射用蒸留水に溶解して使用する。本品は、骨髓異形成症候群、白血病、骨髓への癌転移、骨髓腫、ホジキン氏病、リンパ肉腫、骨髓繊維病、骨髓硬化症、肥大型骨関節症、大理石骨病、パンチ症候群、細網肉腫、梅毒あるいは悪性腫瘍などによって引き起こされる血小板減少症、および、悪性腫瘍の治療として用いられる放射線療法や化学療法の副作用として誘起される血小板減少を予防および/または治療するための注射用血小板増多促進剤として使用できる。

【0043】

【実施例3】ヒト血清アルブミンを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する $10\text{w}/\text{v}\%$ マルトース液 $100\text{ml}$  ( $\text{pH}7.0$ )に、比活性約 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型ヒト $\text{IFN-}\gamma$  (日本ケミカルリサーチ株式会社製)、比活性約 $1\times 10^5$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型ヒト $\text{SCF}$  (ゼンザイム社製、米国)、および比活性約 $2\times 10^7$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型ヒト $\text{IL-3}$  (ゼンザイム社製、米国)とを、 $\text{ml}$ 当たりそれぞれ $5\times 10^4$ 単位、 $3\times 10^5$ 単位および $5\times 10^5$ 単位となるように溶解して液状の血小板増多促進剤を得た。

【0044】本品は、 $4^\circ\text{C}$ 保存下で6カ月以上に亘って有効成分のヒト $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{SCF}$ および $\text{IL-3}$ の活性が安定に保たれた。本品は、各種疾患および放射線療法や化学療法の副作用として誘起される血小板減少を予防および/または治療するための血小板増多促進剤として有利に使用できる。

【0045】

【実施例4】ゼラチンを $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する $10\text{w}/\text{v}\%$ スクロース液 $100\text{ml}$  ( $\text{pH}7.0$ )に、比活性約 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有するヒト遺伝子組換え型 $\text{IFN-}\gamma$  (日本ケミカルリサーチ株式会社製)と、天然型ヒト $\text{EPO}$  (チャイナ・ニューテック・ディベロプメント・アンド・トレード社製、中国)とを $\text{ml}$ 当たりそれぞれ $2\times 10^2$ 単位および $2\times 10^6$ 単位となるように溶解して、筋注用血小板増多促進剤を得た。

【0046】本品は、 $4^\circ\text{C}$ 保存下で6カ月以上に亘ってヒト $\text{IFN-}\gamma$ および $\text{EPO}$ の活性が安定に保たれた。本品は、各種疾患および放射線療法や化学療法の副作用として誘起される血小板減少を予防および/または治療するための血小板増多促進剤として有利に使用できる。

【0047】

【実施例5】比活性約 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型ヒト $\text{IFN-}\gamma$  (日本ケミカルリサーチ株式会社製)と、高純度遺伝子組換え型ヒト $\text{G-CSF}$  (三共株式会社製)を常法に従って澱粉とマンニトールとを混合して打錠し、ヒト $\text{IFN-}\gamma$ および $\text{G-CSF}$ を製品1錠 ( $200\text{mg}$ ) 当たりそれぞれ $3\times 10^3$ 単位および $1\times 10^4$ 単位となるように配合して錠剤を得た。

【0048】本品は、ヒトの血小板減少症を予防および/または治療するための血小板増多促進剤として有利に使用できる。

【0049】

【実施例6】比活性約 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する天然型ヒト $\text{IFN-}\gamma$  (日本ケミカルリサーチ株式会社製)、比活性 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質の遺伝子組換え型ヒト $\text{GM-CSF}$  (セルバ社製、独国)および無水結晶マルトース (商品名「ファイントース」、株式

会社林原生物化学研究所製)とを混合後、常法に従って打錠し、製品1錠 ( $100\text{mg}$ ) 当たりヒト $\text{IFN-}\gamma$ を $1\times 10^4$ 単位およびヒト $\text{GM-CSF}$ を $1\times 10^5$ 単位含有する錠剤を得た。

【0050】本品は、ヒトの血小板減少症を予防および/または治療するための血小板増多促進剤として有利に使用できる。

【0051】

【実施例7】比活性約 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型ヒト $\text{IFN-}\gamma$  (日本ケミカルリサーチ株式会社製)、および遺伝子組換え型ヒト $\text{IL-6}$  (オーストラル・バイオロジカルズ社製、米国)を、最終製品 $\text{g}$ 当たりそれぞれ $50$ 単位および $3\times 10^4$ 単位となるように、常法に従って澱粉とトレハロースとを混合して、粉末状の血小板増多促進剤を得た。

【0052】本品は、室温保存下においても6カ月以上に亘ってヒト $\text{IFN-}\gamma$ および $\text{IL-6}$ の活性が安定に保たれた。本品は、各種疾患および放射線療法や化学療法の副作用として誘起される血小板減少を予防および/または治療するための血小板増多促進剤として有利に使用できる。

【0053】

【実施例8】比活性約 $1\times 10^7$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型マウス $\text{IFN-}\gamma$  (ゼンザイム社製、米国)および比活性 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型マウス $\text{SCF}$ を、 $\text{ml}$ 当たりそれぞれ $50$ 単位および $5\times 10^4$ 単位となるように溶解して、液状の血小板増多促進剤を得た。

【0054】

【実施例9】比活性約 $1\times 10^7$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型マウス $\text{IFN-}\gamma$  (ゼンザイム社製、米国)および比活性 $1\times 10^6$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型マウス $\text{SCF}$ を、 $\text{ml}$ 当たりそれぞれ $1\times 10^7$ 単位および $3\times 10^5$ 単位となるように生理食塩水に溶解して、液状の血小板増多促進剤を得た。

【0055】本品は、マウスの血小板減少症を予防および/または治療するための血小板増多促進剤として有利に使用できる。

【0056】

【実施例10】比活性約 $1\times 10^7$ 単位/ $\text{mg}$ 蛋白質を有する遺伝子組換え型マウス $\text{IFN-}\gamma$  (ゼンザイム社製、米国)、遺伝子組換えマウス $\text{TPO}$ 、および遺伝子組換え型マウス $\text{IL-3}$  (ゼンザイム社製、米国)を、最終製品 $\text{g}$ 当たりそれぞれ $1\times 10^6$ 単位、 $2\times 10^6$ 単位および $1\times 10^6$ 単位となるように、常法に従って澱粉とトレハロースとを混合後、粉末状の血小板増多促進剤を得た。

【0057】本品は、マウスの血小板減少症を予防および/または治療するための血小板増多促進剤として有利に使用できる。

【0058】

【発明の効果】本発明は、IFN- $\gamma$ と血小板増多作用を有する生理活性物質とを同時にヒトを含む哺乳動物に投与すると、生理活性物質の血小板増多作用がIFN- $\gamma$ により著しく増強されるとの新規な知見に基づくものである。本発明の血小板増多促進剤は、有効成分としてIFN- $\gamma$ および生理活性物質を含有し、各種疾患および放射線療法や化学療法副作用として誘起される血小板減少症を効果的に予防および／または治療することができる。

【0059】本発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する意義ある発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な発明である。

【図面の簡単な説明】

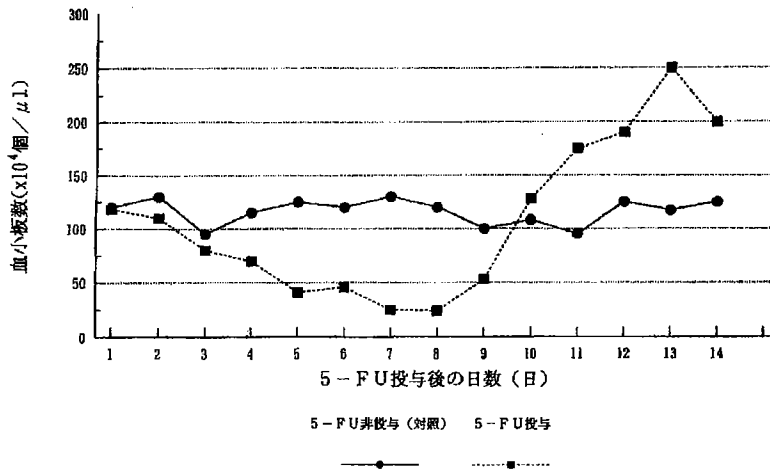
【図1】5-FUにより誘導された血小板減少症モデルマウスの血小板数変動を示すグラフである。

【図2】5-FUにより誘導された血小板減少症モデルマウスに対するIL-3の血小板増多作用を示すグラフである。

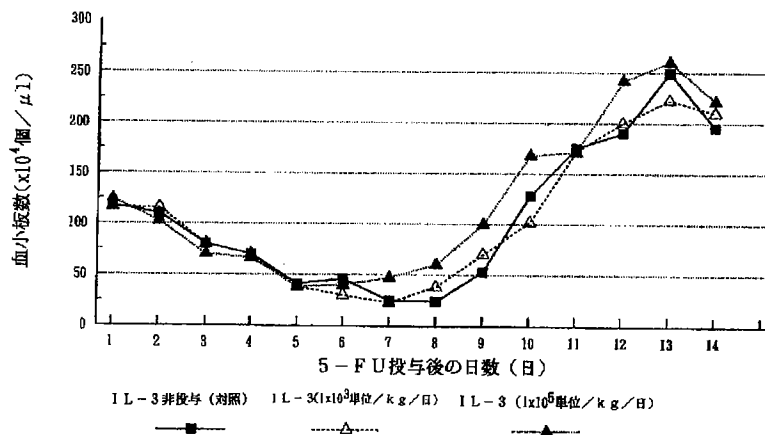
【図3】5-FUにより誘導された血小板減少症モデルマウスに対するIFN- $\gamma$ の血小板数変動に及ぼす影響を示すグラフである。

10 【図4】5-FUにより誘導された血小板減少症モデルマウスに対するIFN- $\gamma$ およびIL-3の血小板増多作用を示すグラフである。

【図1】

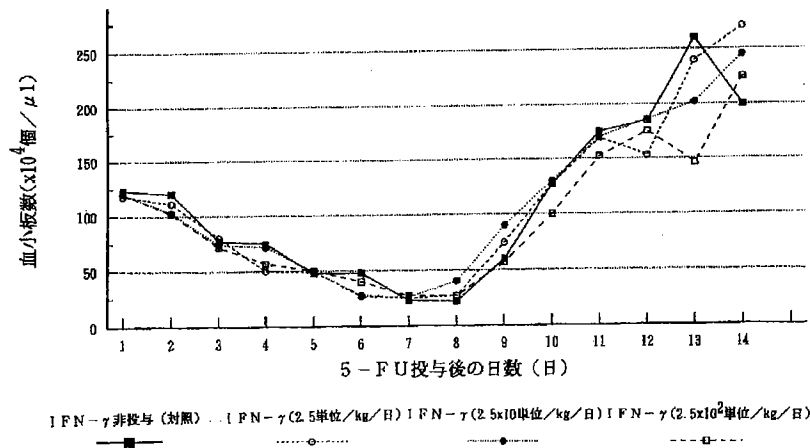


【図2】

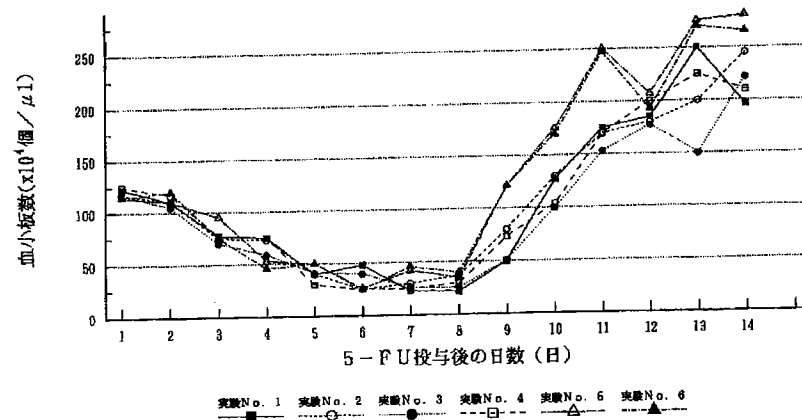




【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A 61 K 38/22

47/02

47/16

47/26

47/36

47/42

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

J

J

J

J

J

A 61 K 37/24

37/66

A C A H